

Opinnäytetyö (AMK)

Bio- ja elintarviketekniikan koulutusohjelma

Biotekniikka

2012

Miro Viitala

UUSIEN ETURAUHASSEN SYÖPÄSOLUJEN KASVUA ESTÄVIEN YHDISTEIDEN VAIKUTUSMEKANISMIIEN TUTKIMINEN



TURUN AMMATTIKORKEAKOULU
TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Miro Viitala

UUSIEN ETURAUHASEN SYÖPÄSOLUJEN KASVUA ESTÄVIEN YHDISTEIDEN VAIKUTUSMEKANISMIIEN TUTKIMINEN

Eturauhasen syöpä on länsimaissa miesten syövästä yleisin ja aiheuttaa toiseksi eniten miesten syöpäkuolemia. Nykyisin varhaisessa vaiheessa havaittuja eturauhasen kasvaimia hoidetaan tavallisesti leikkauksella, kemoterapialla tai säteilyttämällä. Toisinaan tauti kuitenkin uusiutuu ja muuntuu nykyisille hoidoille vastustuskykyiseksi pahanlaatuiseksi eturauhasen syöväksi.

Sekä normaali eturauhasen toiminta että eturauhasen syöpien kehittyminen ja kasvu ovat riippuvaisia androgeenireseptorin (AR) välittämästä androgeenien kasvutekijävaikutuksesta. Useiden eturauhasen syöpien pahanlaatuisuus on seurausta AR-välitteisen säätelyn häiriintymisestä. Koska valtaosassa pahanlaatuksiakin eturauhasen syöpiä AR on yhä tärkeä kasvutekijäreseptori, AR:n toiminnan esto on usein tavoitteena uusien eturauhassyöpälääkkeiden kehityksessä.

Aikaisemmassa solupohjaisessa tehoseulonnassa tutkittiin 4 910 tunnetun lääkeaineen ja pienimolekyylisen yhdisteen vaikutuksia eturauhasen syöpäsolujen ja normaalia eturauhasen epiiteeliä mallintavien solujen kasvuun. Erityisesti eturauhasen syöpäsolujen kasvua estäviä yhdisteitä löydettiin kaiken kaikkiaan vain neljä.

Opinnäytetyössä tutkittiin kahden seulonnassa löydetyn yhdisteen, disulfiraamin (DSF) ja monensiinin, sekä kahden monensiinin kanssa rakenteellisesti samankaltaisen yhdisteen, salinomysiinin ja nigerisiinin, vaikutusmekanismeja eturauhasen syöpäsoluissa. Lisäksi tutkittiin DSF:n ja erään syöpälääkkeen (X) yhteisvaikutusta AR-välitteiseen tiedonsiirtoon.

Sekä DSF, monensiini, salinomysiini että nigerisiini vähensivät AR:n ilmentymistä ja AR-välitteisen säätelyn alaisten geenien luentaa eturauhasen syöpäsoluissa. Yhteiskäytössä X:n kanssa DSF:n AR:n ilmentymistä estävä vaikutus heikentyi. AR:n toiminnan alasajamisen lisäksi monensiini, salinomysiini ja nigerisiini estivät eturauhasen syöpäsolujen kasvua lisäämällä solunsisäistä oksidatiivista stressiä.

ASIASANAT:

eturauhasen syöpä, androgeenireseptori, disulfiraami, monensiini, salinomysiini, nigerisiini

BACHELOR'S THESIS | ABSTRACT

TURKU UNIVERSITY OF APPLIED SCIENCES

Degree Programme in Biotechnology & Food Technology | Biotechnology

March 2012 | 39 pages

Instructors: Docent Kristiina Iljin, Ph.D.; Kirsi Ketola, Ph.D.; Ilari Suominen, Ph.D.

Miro Viitala

STUDY ON THE MOLECULAR MECHANISMS OF NOVEL INHIBITORS OF PROSTATE CANCER CELL GROWTH

Prostate cancer is the most common cancer and the second most common cause of cancer deaths in men in the western world. Current treatment of patients with primary prostate cancer includes surgery, chemotherapy, and radiation. However, sometimes the disease relapses and gives rise to an advanced malignant prostate cancer that is resistant to current treatment options.

Both the normal function of the prostate and the development and growth of prostate cancers depend on androgenic growth factor signalling mediated by the androgen receptor (AR). The malignancy of many prostate cancers is caused by disruptions in AR-mediated signalling. Since AR remains a vital growth factor receptor even in the majority of malignant prostate cancers, inhibiting the function of AR is often a goal in the development of novel prostate cancer drugs.

Previously, the effects of 4,910 drugs and drug-like small molecules on the growth of prostate cancer cells and non-malignant prostatic epithelial cells were studied using cell-based high-throughput screening. Altogether, only four compounds were found to inhibit the growth of prostate cancer cells without any major effects on non-malignant prostatic epithelial cells.

In this Bachelor's thesis, the molecular mechanisms of two compounds identified in the high-throughput screening, disulfiram (DSF) and monensin, and two structural analogues of monensin, salinomycin and nigericin, were studied in prostate cancer cells. In addition, the synergistic effect of DSF and a cancer drug (designated X) on AR signalling was explored.

DSF, monensin, salinomycin, and nigericin all decreased the expression of AR and genes under AR-mediated regulation in prostate cancer cells. A combinatorial exposure to DSF and X decreased the AR signalling-reducing effect of DSF. In addition to downregulating AR function, monensin, salinomycin, and nigericin inhibited the growth of prostate cancer cells by increasing intracellular oxidative stress.

KEYWORDS:

prostate cancer, androgen receptor, disulfiram, monensin, salinomycin, nigericin

SISÄLTÖ

KÄYTETYT LYHENTEET	6
1 JOHDANTO	7
2 TAUSTAA	9
2.1 Androgeenivälitteinen säätely	9
2.2 Eturauhanen	10
2.3 Eturauhasen syöpä	11
2.4 Androgeenireseptori	13
2.5 Eturauhasen syövän mutaatioita	14
2.5.1 T877A-mutaatio	15
2.5.2 <i>TMPRSS2-ERG</i> -geenifuusio	16
3 MATERIAALIT JA METODIT	18
3.1 Syöpäsolulinjat	18
3.2 Lääkeaineet	19
3.3 Western blot -menetelmä	19
3.4 Kvantitatiivinen RT-PCR	21
4 TULOKSET	23
4.1 Disulfiraami ja X	23
4.2 Monensiini, salinomysiini ja nigerisiini	24
4.2.1 Vaikutukset androgeenivälitteiseen säätelyyn	24
4.2.2 Vaikutukset oksidatiiviseen stressiin	29
5 ARVIOINTI	32
5.1 Disulfiraami ja X	32
5.2 Monensiini, salinomysiini ja nigerisiini	33
LÄHTEET	35

KUVAT

Kuva 1. Vasemmalla: western blot -kuva AR-proteiinin ilmentymistason muuttumisesta vasteena monensiinikäsittelylle (1 μ M, +) 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP-soluissa. Oikealla: western blot -kuva AR- ja PSA-proteiinin ilmentymistason muuttumisesta vasteena salinomysiinille (sal.) tai nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP- ja VCaP-soluissa. 25

KUVIOT

Taulukko 1. Käytetyt syöpäsolulinjat ja niiden mutaatiot	18
Taulukko 2. qRT-PCR-alukkeiden sekvenssit	22
Kuvio 1. AR:n ja PSA:n mRNA:n luentatason muuttuminen vasteena DSF:lle ja/tai X:lle (1 μ M) 3:n ja 24 h:n aikapisteessä VCaP-soluissa.	23
Kuvio 2. AR- ja PSA-proteiinin ilmentymistason muuttuminen vasteena DSF:lle ja/tai X:lle (1 μ M) 6:n ja 24 h:n aikapisteessä VCaP-soluissa.	24
Kuvio 3. ERG:n ja MYC:n mRNA:n luentatason muuttuminen vasteena DSF:lle ja/tai X:lle (1 μ M) 3:n ja 24 h:n aikapisteessä VCaP-soluissa.	24
Kuvio 4. AR-proteiinin ilmentymistason muuttuminen vasteena monensiinille (1 μ M) 3:n, 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP-soluissa.	25
Kuvio 5. AR:n mRNA:n luentatason muuttuminen vasteena salinomysiinille (sal.) tai nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 3:n, 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP- ja VCaP-soluissa.	26
Kuvio 6. AR-proteiinin ilmentymistason muuttuminen vasteena salinomysiinille (sal.) tai nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 3:n, 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP- ja VCaP-soluissa.	26
Kuvio 7. PSA:n mRNA:n luentatason muuttuminen vasteena salinomysiinille (sal.) tai nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 3:n, 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP- ja VCaP-soluissa.	27
Kuvio 8. PSA-proteiinin ilmentymistason muuttuminen vasteena salinomysiinille (sal.) ja nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 3:n, 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP- ja VCaP-soluissa.	27
Kuvio 9. ERG:n mRNA:n luentatason muuttuminen vasteena salinomysiinille (sal.) tai nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 3:n, 6:n tai 24 h:n aikapisteessä VCaP-soluissa.	28
Kuvio 10. MYC:n mRNA:n luentatason muuttuminen vasteena salinomysiinille (sal.) tai nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 3:n, 6:n tai 24 h:n aikapisteessä LNCaP- ja VCaP-soluissa.	28
Kuvio 11. Heat map oksidatiiviseen stressiin liittyvien geenien luentatason muutoksista (Kirsi Ketola, 2011).	31

TAULUKOT

Taulukko 1. Käytetyt syöpäsolulinjat ja niiden mutaatiot	18
Taulukko 2. qRT-PCR-alukkeiden sekvenssit	22

KÄYTETYT LYHENTEET

AR	androgeenireseptori
ARE	DBD:t tunnistava sekvenssi AR:n kohdegeenien säätelyalueella (<i>AR response element</i>)
ATF3	proapoptoottinen transkriptiotekijä (<i>activating transcription factor 3</i>)
DBD	AR:n DNA:ta sitova domeeni
DDIT	DNA:n vaurioitumisen seurauksena ilmentyvä proteiini (<i>DNA damage-inducible transcript</i>)
DSF	disulfiraami, aldehydidehydrogenaasin estäjä
ERG	ETS-geeniperheen jäsen (<i>ETS-related gene</i>)
ETV	ETS-geeniperheen jäsen (<i>ETS-variant</i>)
HRP	piparjuuriperoksidaasi
Hsp	lämpöshokkiproteiini
KLF6	proapoptoottinen transkriptiotekijä (<i>Krüppel-like factor 6</i>)
LBD	AR:n ligandia sitova domeeni
LNCaP	imusolmukkeen etäpesäkkeestä eristetty eturauhasen syöpäsolulinja
MT	metallotioneiini
PIN	eturauhasen epiteelin sisäinen kasvannainen (<i>prostatic intraepithelial neoplasia</i>)
PSA	eturauhasspesifinen antigeeni (<i>prostate-specific antigen</i>)
SDS	natriumdodekyylisulfaatti
TMPRSS2	solukalvon läpäisevä seriiniproteaasi (<i>transmembrane protease, serine 2</i>)
TXNIP	tioedoksiineja inhiboiva proteiini (<i>thioredoxin-interacting protein</i>)
VCaP	selkänikaman etäpesäkkeestä eristetty eturauhasen syöpäsolulinja

1 JOHDANTO

Opinnäytetyö tehtiin Turussa VTT:n Lääkekehityksen biotekniikan yksikössä. Opinnäytetyö on osa laajempaa väitöskirjatutkimusta, jonka tarkoituksena on löytää uusia lääkeaineita ja strategioita pahanlaatuisen eturauhasen syövän hoitoon.

Aikaisemmassa 4 910 lääkeaineen ja pienimolekyylisen yhdisteen solupohjaisessa tehoseulonnassa etsittiin eturauhasen syöpäsolujen kasvua estäviä yhdisteitä. Seulonnat tehtiin neljässä eturauhasen syöpäsolulinjassa ja kahdessa normaalia eturauhasen epiteeliä mallintavassa solulinjassa. Useimmat kasvua estävät yhdisteet vaikuttivat yhtä tehokkaasti sekä syöpä- että kontrollisolulinjojen kasvuun. (Iljin & al., 2009.) Kaiken kaikkiaan seulonnoissa löytyi vain neljä yhdistettä, jotka estivät erityisesti eturauhasen syöpäsolujen kasvua.

Opinnäytetyössä tutkittiin kahden tehoseulonnoissa löydetyn, valikoivasti pahanlaatuisten eturauhasen syöpäsolujen kasvua estäneen lääkeaineen, disulfiraamin (DSF) ja monensiinin, vaikutusmekanismeja.

DSF:ää on käytetty jo vuosikymmeniä kroonisen alkoholismin hoidossa. Alkoholismin hoidossa DSF:n vaikutus perustuu sen toimintaan aldehydidehydrogenaasin estäjänä, mutta DSF estää myös muun muassa DNA-topoisomeraasien, matriksin metalloproteiinaasien ja ABC-transporttereiden toimintaa. DSF:n käytöstä muiden syöpien hoidossa on saatu lupaavia tutkimustuloksia (Marikovsky & al., 2002; Brar & al., 2004).

Eturauhassoluilla tehdyissä tehoseulonnoissa DSF:n havaittiin estävän erityisesti VCaP-eturauhassyöpäsolujen kasvua *in vitro*. DSF myös hidasti VCaP-siirrännäisten kasvua *in vivo* -kokeissa, mutta se ei pysäyttänyt siirrännäisten kasvua täysin. Genominlaajuisessa ilmentymisprofiilin kartoituksessa DSF:n havaittiin lisänneen varsinkin metallotioneiniinigeenien luentaa VCaP-soluissa. (Iljin & al., 2009.) Metallotioneiniinien ilmentymisen tiedetään aiempien tutkimusten perusteella suojaavan soluja oksidatiiviselta stressiltä.

Koska DSF hidasti siirrännäisten kasvua *in vivo* ja se on lääkkeenä hyvin tutkittu ja melko turvallinen, päätettiin selvittää, tehostuisiko sen eturauhasen syöpäsolujen kasvua estävä vaikutus yhteiskäytössä muiden lääkeaineiden kanssa (Iljin & al., 2009).

Muut yhdisteseulonnat tunnettujen lääkeaineiden kanssa johtivat erään syöpälääkkeen (X) löytämiseen mahdollisena DSF:n vaikutusta tehostavana yhdisteenä. Opinnäytetyössä tutkittiin X:n vaikutusta VCaP-solujen kasvuun sekä mahdollista hyötyä DSF:n vaikutusta tehostavana yhdisteenä. X estää muun muassa syövän kasvua ja verisuonittumista.

Tehoseulonnoissa monensiini esti valikoivasti sekä LNCaP- että VCaP-eturauhassyöpäsolujen kasvua. Genominlaajuisessa ilmentymisprofiilin kartoituksessa myös monensiinin havaittiin vaikuttavan useiden oksidatiiviseen stressiin liittyvien geenien luentaan. (Ketola & al., 2010.) Mekanismista, jolla monensiini estää eturauhasen syöpäsolujen kasvua, ei kuitenkaan ollut tarkempaa tietoa.

Monensiini on liha- ja meijeriteollisuudessa yleisesti käytetty antibiootti, jota on myös käytetty lihakarjan lihasmassan kasvattamiseen (Mollenhauer & al., 1990). Soluissa monensiini toimii ionoforina. Monensiinin on havaittu estävän valikoivasti eturauhasen syöpäsolujen lisäksi muunkinlaisten syöpäsolujen kasvua *in vitro* (Park & al., 2002; Park & al., 2003a; Park & al., 2003b; Park & al., 2003c).

Toisissa tehoseulonnoissa kahden monensiinin kanssa rakenteellisesti samankaltaisen yhdisteen, salinomysiinin ja nigerisiinin, on havaittu estävän valikoivasti syöpäsolujen kasvua *in vitro* (Hasuda & al., 1994; Gupta & al., 2009). Salinomysiini ja nigerisiini ovat myös ionoforeja ja niitäkin on käytetty antibiootteina eläinlääketieteessä.

Opinnäytetyössä selvitettiin, miten salinomysiini ja nigerisiini vaikuttavat AR-geenin sekä joidenkin AR-proteiinin säätelemien geenien (*PSA*, *ERG* ja *MYC*) luentaan ja ilmentymiseen LNCaP- ja VCaP-soluissa. Lisäksi opinnäytetyössä validoitiin monensiinin oksidatiivista stressiä lisäävä vaikutus sekä testattiin

alustavasti salinomysiinin ja nigerisiinin kykyä lisätä oksidatiivista stressiä LNCaP- ja VCaP-soluissa.

2 TAUSTAA

2.1 Androgeenivälitteinen säätely

Androgeenien eli miessukupuolihormonien välittämä endokriininen eli umpieriteinen säätely käynnistää miehisten sukupuoliominaisuuksien erilaistumisen si-
kiönkehityksen aikana sekä ohjaa niiden myöhempää kehittymistä ja toimintaa. Aikuisessa yksilössä androgeenivälitteinen säätely on tärkeää useiden kudosten, ei vain sukupuolielinten, normaalille toiminnalle (Mooradian & al., 1987).

Eturauhasen rakenteen kehittymiselle ja eturauhasen toiminnalle androgeenit ovat elintärkeä säätelytekijä (Siiteri & Wilson, 1973). Valtaosa verenkierron androgeeneista on kivesten tuottamaa testosteronia. Noin kymmenesosan muodostavat lisämunuaiskuoren erittämät kortikosteroidit. Tärkein hormoni androgeenivälitteisessä säätelyssä on testosteroni.

Testosteronin erittymistä verenkiertoon kontrolloi hypotalamuksen, aivolisäkkeen ja sukupuolirauhasen muodostama järjestelmä. Hypotalamuksen erittämä luliberiini säätelee lutropiinin vapautumista aivolisäkkeen etulohkosta, ja lutropiinin vaikutuksesta kivekset erittävät verenkiertoon testosteronia. Testosteroni säätelee omaa pitoisuuttaan veressä: kohonnut testosteronipitoisuus vähentää luliberiinin erittymistä hypotalamuksesta ja vähentää aivolisäkkeen herkkyyttä luliberiinille.

Androgeenit ovat rasvaliukoisia hormoneja ja kykenevät siksi vapaasti läpäisemään solukalvon. Androgeenien kohdekudoksissa, kuten eturauhasessa, entsyymi 5 α -reduktaasi muuntaa testosteronista dihydrotestosteronia, joka on testosteronia voimakkaammin vaikuttava androgeeni ja saa aikaan erilaisia vasteita kuin testosteroni (Wilbert & al., 1982).

Kaikkien androgeenien vaikutuksia välittää sama proteiini, androgeenireseptori (AR) (Cooke & al., 1991). AR:ää ilmentyy kaikissa androgeenivälitteisen säätelyn alaisissa kudoksissa ja AR:n synteesi on myös androgeenien säätelemää (Blanchere & al., 1998; Mora & Mahesh, 1999).

2.2 Eturauhanen

Eturauhanen on virtsarakon kaulaa ja virtsaputken alkuosaa ympäröivä lisäsukupuolirauhanen. Normaali aikuisen miehen eturauhanen on noin saksanpähkinän kokoinen. Eturauhanen tuottaa osan siittiöitä suojaavasta ja ravitsevasta siemenplasmasta, joka siemensyöksyssä sekoittuu siittiöihin ja rakkularauhasten eritteisiin.

Eturauhasen muodostaa pääosin kaksi kudostyyppiä: rauhasrakkuloiksi järjestäytynyt eksokriininen eli avoeritteinen epiteeli ja sitä tukeva sidekudoksesta, siileälihaskudoksesta ja verisuonista koostuva peruskudos. Eturauhasen epiteelistä voidaan lisäksi erottaa tyvisolukko ja varsinainen erittävä rauhasepiteelisolukko. (Dehm & Tindall, 2005.)

Eturauhasessa androgeenien on havaittu osallistuvan satojen eri geenien luenan säätelyyn ja sitä kautta vaikuttavan muun muassa kasvutekijöiden synteesiin, solusykliin, solukuolemaan ja solujen liikkumisen säätelyyn (Xu & al., 2001; Velasco & al., 2004; Jariwala & al., 2007; Romanuik & al., 2009).

Eturauhasen avoeritteisille rauhasepiteelisoluille androgeenit ovat tärkeä selviytymis- ja säätelytekijä (Kyprinaou & Isaacs, 1988). Androgeenit edistävät rauhasepiteelin solujen erilaistumista, hillitsevät niiden jakatumista ja säätelevät siemenplasman komponenttien tuottamista ja erittymistä. Yksi tunnetuimmista androgeenivälitteisen säätelyn alaisista erittyvistä proteiineista on PSA (*prostate-specific antigen*).

Eturauhasen epiteelin tyvisolut ovat erilaistumattomia eivätkä vaadi androgeenivälitteistä säätelyä selvitäkseen (Kyprianou & Isaacs, 1988), mutta andro-

geenit edistävät niiden jakautumista ja erilaistumista avoeritteisiksi rauhasepiteelisoluiksi (Hayward & al., 1996).

Eturauhasen peruskudoksen toiminta on myös androgeenivälitteisen säätelyn alaista. Vasteena androgeeneille peruskudos erittää erilaisia kasvutekijöitä, jotka säätelevät parakriinisesti eturauhasen epiteelin toimintaa (Blanchere & al., 1998). Eturauhasen peruskudoksen erittämät kasvutekijät ovat välttämättömiä eturauhasen epiteelin solunjakautumisen ja toiminnan säätelyssä (Cunha & al., 2002).

2.3 Eturauhasen syöpä

Eturauhasen syöpä on Suomessa sekä muissa länsimaissa miesten syövästä yleisin ja toiseksi yleisin miesten syöpäkuolemien syy. Ikääntyminen kasvattaa huomattavasti riskiä sairastua eturauhasen syöpään: alle 40-vuotiailla miehillä on havaittu vain satunnaisia eturauhasen syöpätapauksia, kun taas yli 60-vuotiaiden miesten joukossa havaittujen tapausten määrä kasvaa huomattavasti. (Suomen Syöpärekisteri, 2009.)

Syöpäsolut toimivat monisoluisten eliöiden toiminnalle olennaisimpia sääntöjä vastaan kaikin mahdollisin tavoin. Toisin kuin normaalit solut, joiden jakautuminen, erilaistuminen, liikkuminen ja kuoleminen ovat tarkasti säädeltyjä, syöpäsolut jakautuvat hallitsemattomasti ja voivat tunkeutua kasvamaan kudoksiin ja elimiin, joihin ne eivät kuulu. Syövän vaarallisuus perustuu näihin kahteen ominaisuuteen.

Tavallisesti syövän kehittyminen alkaa, kun yhden solun perimässä tapahtuu mutaatio, joka ei korjaannu, mutta joka antaa solulle ja sen jälkeläisille jonkinlaisen kilpailuedun muihin soluihin verrattuna. Syövän kehittymisen käynnistävät mutaatiot tapahtuvat usein solunjakautumista, solukuolemaa ja DNA:n korjausta säätelevissä niin sanotuissa proto-onkogeeneissä eli esisyöpägeeneissä tai kasvunrajoitegeeneissä (Germann, 2008).

Poikkeavasta solusta ja sen jälkeläisistä syntyy joukko keskenään kilpailevia epänormaaleja soluja. Aluksi solut muodostavat niin sanotun hyvänlaatuisen kasvaimen. Ajan kuluessa kasvaimen soluissa tapahtuu lisää mutaatioita. Syövän jokaisessa kehitysvaiheessa jossakin solussa tapahtunut mutaatio lisää entisestään solun kilpailukykyä kasvaimen muihin soluihin nähden, kunnes kasvainta vallitsee kilpailun voittanut solulinja. Olennainen vaihe syövän kehityksessä on solujen muuntuminen pahanlaatuisiksi, jolloin ne saavat kyvyn liikkua ja muodostaa alkuperäisestä kasvaimesta erillisiä etäpesäkkeitä (Germann, 2008).

Eturauhasen syöpien, kuten muidenkin adenokarsinoomien eli rauhasepiteeli-peräisten syöpien, kehittyminen vaatii edellä kuvatun kaltaista asteittaista mutaatioiden kertymistä ja pahanlaatuisten solujen keskinäistä kilpailua (Kinzler & Vogelstein, 1996).

Ensimmäinen vaihe eturauhasen syövän kehityksessä on eturauhasen epiteelinsisäinen kasvannainen (PIN [*prostatic intraepithelial neoplasia*]). Ajan kuluessa PIN kehittyy paikalliseksi eturauhasen epiteelin syöväksi ja lopulta etäpesäkkeitä muodostavaksi eturauhasen karsinoomaksi. (Germann, 2008.)

Eturauhasen syöpä on hyvin monimuotoinen tauti – syöpään johtavien mutaatioiden luontaisen satunnaisuuden takia jokainen eturauhasen syöpä on yksilöllinen. Jopa yhden eturauhasen eri osista voidaan löytää monta erilaista muuntunutta solulinjaa (Bostwick & al., 1998).

Varhaisessa vaiheessa eturauhasen syöpä voidaan poistaa leikkaamalla, häiritsemällä androgeenien toimintaa kemiallisesti tai säteilyttämällä. Toisinaan syöpä kuitenkin uusiutuu. Käytetyin hoitokeino varsinkin pitkälle edenneissä eturauhasen syövässä jo 1940-luvulta lähtien on ollut niin sanottu androgeeninriistohoito, joka perustuu syöpäsolujen kasvun hillitsemiseen androgeenivälitteistä säätelyä häiritsemällä. (Eisenberger, 2008.)

Kuten normaali eturauhanen, myös eturauhasen syövä ovat riippuvaisia androgeenivälitteisestä säätelystä (Huggins & Hodges, 1941). Androgeeninriistohoi-

dossa verenkierron androgeenien määrä supistetaan mahdollisimman pieneksi joko fysikaalisella kastratiolla tai luliberiinianalogeilla, jotka estävät lutropiinin erittymistä aivolisäkkeen etulohkosta ja siten estävät testosteronin erittymistä kiveksistä. Hoitoon yhdistetään tavallisesti AR-salpaajia, jotka estävät verenkierron kortikosteroideja aktivoimasta AR:ää. (Eisenberger, 2008.)

Androgeeninriisto on lähes aina aluksi erittäin tehokas hoitokeino, mutta useimmiten androgeeninriiston positiivinen hoitovaste on vain väliaikainen (Eisenberger, 2008). Syöpään johtanut pahanlaatuisten solulinjojen välinen kilpailu jatkuu hoidon aikana. Androgeeninriistohoidon seurauksena androgeenivälitteisestä säätelystä vapautuneet eturauhasen syöpäsolut saavat selkeän kilpailuedun, minkä seurauksena usein kehittyy niin sanottu androgeeneista riippumaton eturauhasen syöpä, johon ei tällä hetkellä ole parantavaa hoitokeinoa.

2.4 Androgeenireseptori

Androgeenit säätelevät geenien ilmentymistä kohdesoluissaan androgeenireseptorin (AR) välityksellä (Cooke & al., 1991). AR kuuluu steroiditumareseptorien perheeseen, jonka muita jäseniä ovat muun muassa progesteroni- ja estrogeenireseptorit (Evans, 1988). Steroiditumareseptorit aktivoituvat, kun niihin sitoutuu spesifinen ligandi, steroidihormoni. Aktivoituneet tumareseptorit siirtyvät tumaan ja sitoutuvat spesifisiin kohdegeenien säätelyalueilla sijaitseviin tunnistukohtiin, mikä muuttaa kohdegeenien luentaa.

AR-proteiinin rakenne muodostuu samoista toiminnallisista yksiköistä kuin muidenkin steroiditumareseptorien: N-terminaalin transaktivaatiodomeenista, DNA:ta sitovasta domeenista (DBD) ja C-terminaalin ligandia sitovasta domeenista (LBD) (MacLean & al., 1997).

Inaktiivisessa, ligandittomassa muodossa AR sijaitsee suurimmaksi osaksi solulimassa lämpöshokkiproteiineihin (Hsp) sitoututuneena (Pratt & Toft, 1997). Hsp:t pitävät AR:n konformaation ligandia tehokkaasti sitovassa muodossa. AR aktivoituu, kun ligandi sitoutuu LBD:hen. Ligandin sitoutuminen saa aikaan muutoksen AR:n konformaatiossa, minkä seurauksena Hsp irtoaa ja erilaisia säätely-

proteiineja sitoutuu AR:ään. Säätelyproteiinit mm. stabiloivat aktivoituneen AR:n rakennetta ja edistävät sen siirtymistä tumaan. (Shang & al., 2002.)

Aktiiviset AR-kompleksit muodostavat dimeerejä. Tumassa aktiiviset AR-dimeerikompleksit sitoutuvat AR:n kohdegeenien säätelyalueelle DBD:t tunnistavan sekvenssin, ARE:n (*AR response element*), kohdalle. AR-dimeerikompleksin sitoutuminen DNA:han mahdollistaa vielä muiden säätelyproteiinien sekä perustranskriptiokoneiston kiinnittymisen geenin säätelyalueelle, mikä joko käynnistää tai lopettaa androgeenivälitteisen säätelyn alaisen geenin luennan (Naar & al., 2001; Shang & al., 2002).

AR:ään sitoutunut ligandi määrää sen, kuinka stabiili aktiivisen AR-dimeerikompleksin ja DNA:n välinen sidos on, ja siten sen, kuinka kauan kohdegeeniä luetaan (Klokk & al., 2007). Kun ligandi irtoaa, AR-dimeerikompleksin rakenne purkautuu ja ligandittomat AR:t siirtyvät tumasta takaisin solulimaan.

2.5 Eturauhasen syövän mutaatioita

Kuten edellä on todettu, sekä normaali eturauhasen toiminta että eturauhasen syöpien kehittyminen ja kasvu ovat riippuvaisia AR:n välittämästä androgeenien kasvutekijävaikutuksesta. Androgeeninriistohoidon alkuvaiheessa tavallisesti havaittu positiivinen hoitovaste johtuu AR:n määrän ja aktiivisuuden vähenemisestä. Muutokset AR:n toiminnassa selittävät, miksi androgeeninriistohoito tehoaa vain väliaikaisesti ja miten jotkin syöpäsolulinjat vapautuvat androgeenivälitteisestä säätelystä (Feldman & Feldman, 2001).

Nimestään huolimatta androgeeneista riippumattomat eturauhasen syövät ovat enemmän tai vähemmän riippuvaisia androgeeneista tai AR:n välittämästä kasvutekijävaikutuksesta. Suuressa enemmistössä eturauhasen syöpiä AR on aktivoitunut voimakkaaksi syöpägeeniksi. Useimmissa eturauhasen syövissä AR:ää tuotetaan läpi syövän kehityskaaren (Ruizeweld de Winter & al., 1994), ja AR:n aktivoituminen pysyvästi on viimeinen askel androgeeneista riippumattomien eturauhasen syöpien kehittymisessä (Germann, 2008). Kuitenkin valtaosassa eturauhasen syöpiä AR on syöpäsoluille yhä tärkeä kasvutekijäreseptori, minkä

vuoksi sekä AR:n että AR:n säätelyproteiinien toiminnan alasajaminen on usein tavoitteena uusien eturauhassyöpälääkkeiden kehityksessä.

AR:n epänormaali aktivoituminen voi tapahtua usean eri mekanismin kautta, jotka voivat toimia samanaikaisesti ja vahvistaa toistensa vaikutusta. Eturauhasen syöpäsolut voivat yliherkistyä androgeeneille niin, että lähes olemattomat pitoisuudet androgeeneja riittävät AR:n aktivaatioon. *AR*-geenin tai AR:n säätelytekijöiden mutaatiot voivat muuttaa AR-proteiinin rakennetta siten, että muutkin ligandit kuin androgeenit voivat aktivoida AR:n tai siten, että AR on pysyvästi aktiivinen ilman ligandiakin. Erilaiset häiriöt kasvutekijöiden tiedonsiirtoreiteissä voivat myös aktivoida AR:n ilman ligandia. Joissakin tapauksissa androgeenivälitteiselle säätelylle tyypillisten tiedonsiirtoreittien aktivoituminen voi täysin ohittaa AR:n, mutta saada silti aikaan yhtäläisen vaikutuksen. (Feldman & Feldman, 2001.)

Seuraavissa osioissa käsitellään kahta tämän opinnäytetyön kannalta keskeistä eturauhasen syövissä havaittua mutaatiota, LNCaP-soluissa esiintyvää *AR*-geenin T877A-pistemutaatiota (Horoszewicz & al., 1983) ja VCaP-soluissa havaittua *TMPRSS2-ERG*-geenifuusiota (Korenchuk & al., 2001).

2.5.1 T877A-mutaatio

Androgeeninriistohoidon antama kilpailuetu kohdistuu sellaisiin eturauhasen syöpäsolulinjoihin, joissa tapahtuneet mutaatiot sallivat niiden tulla toimeen selkeästi normaalia pienemmällä määrällä androgeeneja. Huomattava osa tällaisista mutaatioista kohdistuu *AR*-geeniin, johon mutaatioita on tavallisesti kertynytkin sitä enemmän, mitä pidemmälle syöpä on kehittynyt (Taplin & al., 1995; Marcelli & al., 2000). Mutaatioiden seurauksena AR:n välittämä kasvutekijävaikutus pysyy normaalina tai jopa voimistuu äärimmäisestäkin androgeeninriistohoidosta huolimatta.

Liki 80 % eturauhasen syövissä havaituista *AR*-geenin mutaatioista on kohdistunut alueelle, joka muodostaa alle kymmenesosan *AR*-geenistä. Suurin osa

näistä mutaatioista on C-pään LBD:tä koodaavien eksonien pistemutaatioita. (Buchanan & al., 2001.)

Eturauhasen syöpiin valikoituvat sellaiset mutaatiot, jotka johtavat LBD:n ligandispesifisyyden vähenemiseen, minkä seurauksena AR:ää aktivoivien ligandien määrä kasvaa (Buchanan & al., 2001). Tällöin androgeenien korvaajina voivat toimia muut steroidihormonit, kuten kortikosteroidit tai progesteroni, tai jopa AR-salpaajat (Veldscholte & al., 1992; Culig & al., 1993; Zhao & al., 2000).

Yleisin havaittu AR-geenin pistemutaatio on T877A-mutaatio, jossa AR-proteiinin 877. aminohappo, treoniini, on vaihtunut alaniiniksi. Mutaatio vähentää AR:n ligandispesifisyyttä ja sallii sekä kortikosteroidien, estradiolin, progesteronin että AR-salpaajana käytetyn hydroksiflutamidin aktivoivan AR:ää. (Veldscholte & al., 1992.)

Osassa tapauksia eturauhasen syöpään valikoituvien mutaatioiden laatu näyttää riippuvan siitä, millä AR-salpaajalla sitä hoidetaan. Esimerkiksi hoitaminen hydroksiflutamidilla edistää juuri T877A-mutaation sisältävien syöpäsolulinjojen valikoitumista (Taplin & al., 1998). Vaikka androgeeninriisto AR-salpaajilla siis onkin aluksi hyvin tehokas hoitokeino, näyttää se olevan myös yksi syy androgeeneista riippumattoman eturauhasen syövän kehittymiselle.

2.5.2 *TMPRSS2-ERG*-geenifuusio

AR:n eri mutaatioiden lisäksi erityisesti eturauhasen syövissä paljon havaittu somaattinen mutaatio on geenifuusio *TMPRSS2*-geenin ja jonkin ETS-geeniperheen jäsenen, *ETV1*:n, *ETV4*:n, *ETV5*:n tai *ERG*:n, välillä (Tomlins & al., 2005; Tomlins & al., 2006; Helgeson & al., 2008). Yhdestä solulinjasta on havaittu vain yhdenlaista geenifuusiota, ja esimerkiksi *TMPRSS2-ETV1*- ja *TMPRSS2-ERG*-geenifuusioiden on osoitettu toisensa poissulkeviksi (Tomlins & al., 2005; Tomlins & al., 2008). Eri *TMPRSS2-ETS*-geenifuusioiden toimintatapa on kuitenkin eturauhasen syövissä samanlainen (Helgeson & al., 2008).

ETS-geeniperheeseen kuuluu useita transkriptiotekijöitä, jotka säätelevät solujen liikkumiseen ja erilaistumiseen sekä solunjakautumiseen, solukuolemaan ja verisuonittumiseen osallistuvien geenien luentaa. ETS-geenien toiminnan säätely on hyvin monitasoista ja niiden vaikutus solun ilmentämiin proteiineihin on olosuhteista ja kudoksesta riippuvaista. (Seth & Watson, 2005.) Muun muassa solunjakautumiseen, solujen liikkumiseen ja verisuonittumiseen liittyvien toimintojensa takia ETS-geenit ovat yleisesti tunnettuja ja voimakkaita esisyöpägeenejä.

TMPRSS2 on androgeenivälitteisen säätelyn alainen geeni (Lin & al., 1999), joka koodaa erästä seriiniproteaasia. *TMPRSS2*-proteiinia ilmentyy ja erittyy varsinkin eturauhasen avoeritteisistä rauhasepiteelisoluista. *TMPRSS2* ilmentyy myös huomattavasti eturauhasen syöpäkudoksessa. (Afar & al., 2001.)

Yleisin *TMPRSS2*:n ja ETS-perheen välinen eturauhasen syövissä havaittu geenifuusio on *TMPRSS2-ERG* (Tomlins & al., 2005; Iljin & al., 2006; Tomlins & al., 2006). *ERG* on myös yleisimmin eturauhasen syövissä aktivoitunut esisyöpägeeni (Petrovics & al., 2005).

TMPRSS2 ja *ERG* voivat fuusioitua useista eri kohdista (Tomlins & al., 2005; Iljin & al., 2006; Clark & al., 2007). Useimmiten fuusion seurauksena syntyyseen fuusiogeeniin siirtyy *TMPRSS2*:sta vain avoimen lukukehyksen ulkopuolisia sekvenssejä eikä fuusiogeeni koodaa fuusioproteiinia, vaan joko typistynyttä tai kokonaista *ERG*-proteiinia (Clark & al., 2007).

Androgeenivälitteisen säätelyn alaisen *TMPRSS2*:n fuusioituminen *ERG*-geeniin johtaa *ERG*:n siirtymiseen androgeenivälitteisen säätelyn alaisuuteen (Tomlins & al., 2005), mikä selittää *ERG*:n epänormaalin ilmentymisen eturauhasen syöpäsoluissa, joissa kyseinen geenifuusio on tapahtunut ja joissa AR on syystä tai toisesta pysyvästi aktivoitunut. *ERG* ei ilmennyt terveessä eturauhasessa.

ERG:n yli-ilmentyminen aiheuttaa eturauhasen epiteelisolujen hyvänlaatuista liikkakasvua, muttei yksin riitä muuntamaan soluja pahanlaatuisiksi. Eturauhasen

syöpäsoluissa ERG lisää solujen kykyä tunkeutua viereisiin kudoksiin muun muassa aktivoimalla soluväliaineen hajottamiseen osallistuvien proteiinien ilmentymistä (Tomlins & al., 2008).

Vaikka eturauhasen hyvänlaatuisten kasvainten ja eturauhasen syöpien ilmentymisprofiili on samankaltainen (Tomlins & al., 2007a), ERG:n yli-ilmentymistä tai *TMPRSS2-ERG*-geenifuusioita ei ole havaittu eturauhasen hyvänlaatuisissa kasvaimissa (Tomlins & al., 2007b). *TMPRSS2*:n fuusioituminen johonkin ETS-geeniperheen jäseneseen ja siitä seuraava ETS-geenin yli-ilmentyminen vaikuttaa siis olevan tärkeä vaihe ja erityisesti syöpäsolujen liikkuvuutta edistävä tekijä eturauhasen syövän kehittämisessä.

3 MATERIAALIT JA METODIT

3.1 Syöpäsolulinjat

Tutkimukseen käytettyjen solulinjojen mutaatiot AR:n ja *TMPRSS2-ETS*-geenifuusion suhteen on koottu taulukkoon 1. VCaP-solut yli-ilmentävät ERG-syöpägeeniä ja sitä käytetään *TMPRSS2-ERG*-fuusiogeeniä ilmentävien pahanlaatuisten eturauhasen syöpien mallinnukseen (Korenychuk & al., 2001; Tomlins & al., 2005). LNCaP-soluissa *TMPRSS2*:een on fuusioitunut ETS-perheestä *ETV1*-geeni, jota se ilmentää (Tomlins & al., 2007).

Taulukko 1. Käytetyt syöpäsolulinjat ja niiden mutaatiot

Solulinja	Alkuperä	AR	<i>TMPRSS2-ETS</i>
VCaP	selkänikaman etäpesäke	wt	<i>ERG</i>
LNCaP	imusolmukkeen etäpesäke	T877A	<i>ETV1</i>

Sekä VCaP- että LNCaP-solut ilmentävät AR:ää (van Bokhoven & al., 2003). VCaP-soluissa ilmentyvä AR on normaalia wild type (wt) -muotoa. LNCaP-solujen AR-proteiinissa on T877A-pistemutaatio, minkä vuoksi progesterogeenit, estradioli ja eräät AR-salpaajat voivat aktivoida AR:n (Horoszewicz & al., 1983).

3.2 Lääkeaineet

Monensiini, salinomysiini ja nigerisiini hankittiin Sigma-Aldrichilta ja laimennettiin etanoliin. Disulfiraami ja X hankittiin Flukalta ja laimennettiin dimetyylisulfoksidiin.

3.3 Western blot -menetelmä

Western blot on laajalti käytetty analyttinen menetelmä, jolla voidaan tunnistaa spesifisiä proteiineja solu- ja kudospäätteistä. Western blot -menetelmässä proteiinit denaturoidaan ja niiden varaus saatetaan negatiiviseksi natriumdodekyyli-sulfaattilla (SDS). Negatiivisesti varautuneet proteiinit erotellaan elektroforeettisesti molekyylipainon perusteella polyakryyliamidigeelillä. Erotellut proteiinit siirretään geelistä hydrofobisen kalvon pinnalle, jolla niitä voidaan värjätä erilaisilla vasta-aineilla. Spesifisten vasta-aineiden avulla voidaan solun kaikkien proteiinien joukosta tunnistaa tietyt kiinnostuksen kohteena olevat proteiinit. Opinnäytetyössä western blot -menetelmällä tutkittiin lääkeaineiden vaikutusta androgeenivälitteiseen säätelyyn liittyvien proteiinien, AR:n ja PSA:n, määrään.

Solut maljattiin noin 70 %:n konfluenssiin ja niiden annettiin kiinnittyä viljelyastian pohjaan yön yli. Lääkeaineiden (konsentraatio 1 μ M) annettiin vaikuttaa 3, 6 tai 24 h, minkä jälkeen solut hajotettiin Laemmlin näytepuskurilla (62,5 mM Trisiä, 1 % SDS:ää, 5 % β -merkaptotaetanolialla, 10 % glyserolia, bromifenolisinistä). Solu-uutteet säilytettiin -20°C :ssa. Verrokkeina käytettiin pelkällä liuotinaaineella käsiteltyjä soluja. Proteiinien ilmentymisen perustasona käytettiin β -aktiinin määrää. β -aktiini on solun tukirangan proteiini, jonka määrä soluissa on normaalisti melko muuttumaton.

Pakastetut solu-uutteet sulatettiin jäähauteella ja laimennettiin Laemmlin näytepuskurilla (1 osa solu-uutetta 3 osaan puskuria). Näytteitä denaturoitiin kuivahteella 95°C :ssa 5 min, minkä jälkeen ne sekoitettiin pikaisesti vorteksoimalla ja sentrifugoitiin. Proteiinit eroteltiin polyakryyliamidigeeleillä (kasvava polyakryyliamidigradientti 4:stä 20 %:iin). Elektroforeesi kesti 120 min 90 V:n jännit-

teellä. Proteiinit siirrettiin geeleistä hydrofobisille nitroselluloosakalvoille sähkövirran avulla (20 V:n jännitteellä 30 min) Bio-Radin Semi-Dry Transfer Modulilla.

Siirron jälkeen kalvot huuhdeltiin TBST:llä ja niitä blokattiin 5-prosenttisella (w/v) BSA-TBST-liuoksella 1–2 h. (TBST eli neutraaliin pH:hon Trisillä puskuroitu salliini-Tween-20-liuos sisälsi 150 mM NaCl:a ja 0,1 % Tween-20:tä.) BSA sitoutuu kalvon pinnalle ja täyttää tyhjät alueet, joihin proteiinien tunnistamiseen käytettävät vasta-aineet muuten sitoutuisivat. Blokkaamisen jälkeen kalvoja huuhdeltiin TBST:llä 3 × 10 min.

Kalvot värjättiin tutkittavien proteiinien, AR:n (hiiriperäinen, monoklonaalinen, MS-443-P1, NeoMarkers), PSA:n (kaniperäinen, monoklonaalinen, A0562, DakoCytomation) ja β -aktiinin (hiiriperäinen, monoklonaalinen, A1978, Sigma-Aldrich), spesifisillä primäärisillä vasta-aineilla. Primääriset vasta-aineet laimennettiin 1:1 000 (AR, PSA) tai 1:4 000 (β -aktiini) 5-prosenttiseen BSA-TBST-liuokseen. Kalvoja värjättiin noin 5 ml:lla kutakin vasta-aineliuosta kerrallaan noin 1 h huoneenlämmössä tai yön yli 4 °C:ssa, minkä jälkeen ne huuhdeltiin TBST:llä 3 × 10 min.

Sekundäärisenä vasta-aineena käytettiin piparjuuriperoksidaasi (HRP) -konjugoitua, joko hiiren (AR:lle ja β -aktiinille) (NA931V, GE Healthcare) tai kanin (PSA:lle) (NA934V, GE Healthcare) antigeeneja tunnistavaa polyklonaalista vasta-aineliuosta. Sekundaarinen vasta-aine laimennettiin 5-prosenttiseen BSA-TBST-liuokseen 1:4 000. Proteiineja leimattiin noin 5 ml:lla jompaakumpaa sekundääristä vasta-aineliuosta noin 1 h huoneenlämmössä tai yön yli 4 °C:ssa, minkä jälkeen niitä huuhdeltiin TBST:llä 3 × 10 min ja säilytettiin TBST:ssä 4 °C:ssa.

Leimattujen proteiinien havaitsemiseen käytettiin valmistajan ohjeen mukaan valmistettua ECL-liuosta 1 ml/kalvo (Amersham Biosciences). Liuoksen annettiin vaikuttaa noin 1 min huoneenlämmössä, minkä jälkeen kalvoja käytettiin röntgenfilmien valottamiseen. ECL-liuos käynnistää sekundäärisen vasta-aineen HRP-konjugaatin kemiluminesenssin, jonka voimakkuus riippuu sitoutuneen vasta-aineen ja siten tutkittavan proteiinin määrästä. Röntgenfilmejä valo-

tettiin kemiluminesenssin voimakkuudesta riippuen muutamista sekunneista noin puoleen tuntiin tai yön yli 4 °C:ssa, minkä jälkeen ne kehitettiin ja skannattiin.

Skannatuista kalvoista määritettiin AR-, PSA- ja β -aktiinijuovien keskimääräinen pikselitiheys. AR:n ja PSA:n suhteellinen ilmentymistaso määritettiin suhteuttamalla kunkin juovan pikselitiheys vastaavan β -aktiinijuovan pikselitiheyteen.

3.4 Kvantitatiivinen RT-PCR

Kvantitatiivisessa käänteistranskriptaasi-PCR:ssä (qRT-PCR) näytteen sisältämä RNA käännetään vastaavaksi komplementaariseksi DNA:ksi (cDNA) käänteistranskriptaasi (RT) -entsyymien avulla. Käyttämällä koettimia, jotka jokaisen PCR-syklin jälkeen hybridisoituvat niille spesifisiin cDNA-juosteisiin ja lähettävät havaittavan signaalin, voidaan seurata tiettyjen cDNA:iden määrän kasvamista ja kvantitoida alkuperäisessä näytteessä kiinnostuksen kohteena olleiden RNA:iden määrä.

Tässä opinnäytetyössä qRT-PCR:llä tutkittiin lääkeaineiden vaikutusta androgeenivälitteiseen säätelyyn (AR, PSA, ERG, MYC) sekä oksidatiiviseen stressiin (ATF3, KLF6, MT1G, MT1F, DDIT3, DDIT4, TXNIP) liittyvien proteiinien mRNA:n synteesiin.

Solut maljattiin noin 70 %:n konfluenssiin ja niiden annettiin kiinnittyä viljelyastian pohjaan yön yli. Lääkeaineiden (konsentraatio 1 μ M) annettiin vaikuttaa 3, 6 tai 24 h, minkä jälkeen solut hajotettiin RLT-puskurilla (Qiagen). Solu-uutteet säilytettiin -20 °C:ssa. Verrokkeina käytettiin pelkällä liuotinaineella käsiteltyjä soluja. mRNA:n ilmentymisen perustasona käytettiin β -aktiinin mRNA:n määrää.

Solu-uutteista eristettiin kokonais-RNA Qiagenin RNeasy-kitillä valmistajan ohjeiden mukaisesti. Näytteiden RNA-pitoisuus määritettiin spektrofotometrisesti. 500 ng RNA:ta/näyte käänteistranskriptoitui Applied Biosystems'n cDNA-synteesikitillä. qRT-PCR:ään käytettiin Universal Probe Libraryn TaqMan-koettimia ja -alukkeita (Roche Diagnostics, Espoo). Alukkeiden sekvenssit on koottu taulukkoon 2.

Taulukko 2. qRT-PCR-alukkeiden sekvenssit

Geeni	Vasen aluke	Oikea aluke
<i>AR</i>	gccttgctctctagcctcaa	gtcgtccacgtgtaagttgc
<i>PSA</i>	gtgcttgtggcctctcgt	agcaagatcacgctttgttc
<i>ERG</i>	caggatgaatggctcaagga	agttcatcccaacgggtgtct
<i>MYC</i>	caccagcagcgactctga	gatccagactctgacctttgc
<i>ATF3</i>	cgtgagtcctcgggtgctc	gcctgggtgttgaagcat
<i>KLF6</i>	aaagctcccacttgaaagca	cctcccatgagcatctgtaa
<i>MT1F</i>	ccactgcttctcgcttctc	cagggtgcaggagacacca
<i>MT1G</i>	ctagtctcgccctcgggttg	gcattgcactcttgcact
<i>DDIT3</i>	cagagctggaacctgaggag	tggatcagtctggaaaagca
<i>DDIT4</i>	ctggagagctcggactgc	tccaggtgaagccgtgtcttc
<i>TXNIP</i>	acgcttctctggaagacca	aagctcaaagccgaactgt

qRT-PCR suoritettiin Applied Biosystems AB1 Prism 7900 -laitteella. Ilmentymistasot kvantitoitiin $\Delta\Delta$ CT-metodilla RQ manager 1.2 -ohjelmalla (Applied Biosystems). mRNA:iden suhteellisten ilmentymistasojen muuttuminen vasteena lääkeainekäsittelyille laskettiin vertaamalla kunkin proteiinin mRNA:n määrää käsitellyissä soluissa mRNA:n määrän keskiarvoon pelkällä liuotinaineella käsitellyissä verrokeissa. Ilmentymisen kvantitointiin käytettiin 2–4 rinnakkaisnäytettä.

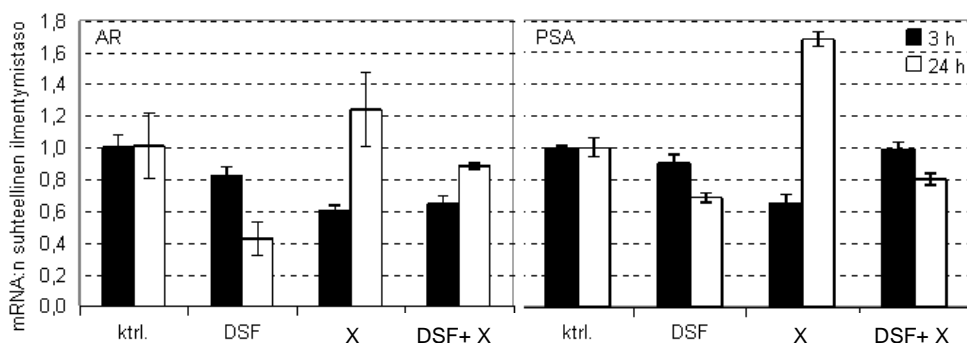
4 TULOKSET

4.1 Disulfiraami ja X

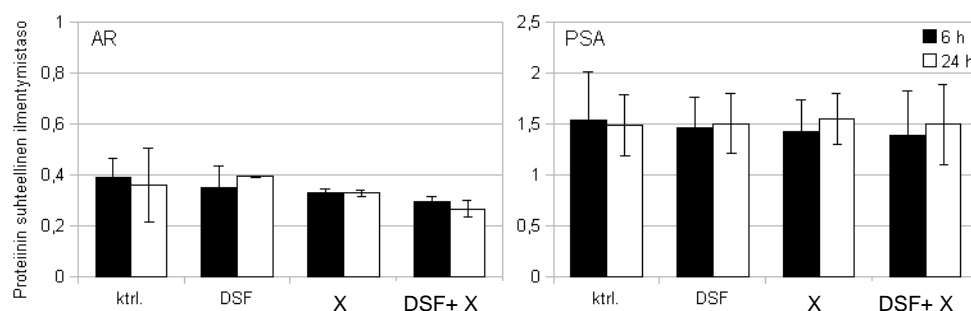
DSF:n ja X:n vaikutusta VCaP-solujen AR-tasoihin ja AR-signalointiin sekä erikseen että yhdessä tutkittiin qRT-PCR:llä ja western blot -menetelmällä. Lääkeaineiden annettiin vaikuttaa 3, 6 tai 24 h ennen solujen hajottamista.

DSF oli vähentänyt sekä *AR*- että *PSA*-geenin luentaa (58 ja 31 % kontrollin tasoa alempi) 24 h:n aikapisteessä. X oli nostanut *AR*:n ja *PSA*:n luentatason kontrollin tasoa suuremmaksi 24 h:n aikapisteessä. Yhteisvaikutuksessa X heikensi DSF:n vaikutusta sekä *AR*:n että *PSA*:n luennan vähentämisessä. (Ks. kuvio 1.)

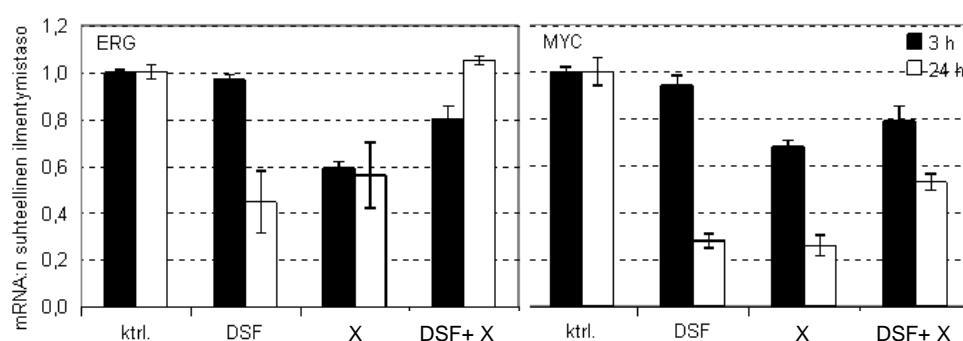
Erikseen käytettyinä sekä DSF että X olivat vähentäneet *ERG*:n luentaa (55 ja 41 %) 24 h:n aikapisteessä, mutta yhteiskäytössä *ERG*:n luenta oli 24 h:n aikapisteessä noussut kontrollin tasolle. Myös *MYC*-geenin luentataso oli vähentynyt 24 h:n aikapisteessä vasteena DSF:lle ja X:lle erikseen (72 ja 74 %), mutta yhteiskäytössä tämäkin vaikutus oli heikentynyt. (Ks. kuvio 3.)



Kuvio 1. *AR*:n ja *PSA*:n mRNA:n luentatason muuttuminen vasteena DSF:lle ja/tai X:lle (1 μ M) 3:n ja 24 h:n aikapisteessä VCaP-soluissa.



Kuvio 2. AR- ja PSA-proteiinin ilmentymistason muuttuminen vasteena DSF:lle ja/tai X:lle (1 µM) 6:n ja 24 h:n aikapisteessä VCaP-soluissa.



Kuvio 3. *ERG*:n ja *MYC*:n mRNA:n luentatason muuttuminen vasteena DSF:lle ja/tai X:lle (1 µM) 3:n ja 24 h:n aikapisteessä VCaP-soluissa.

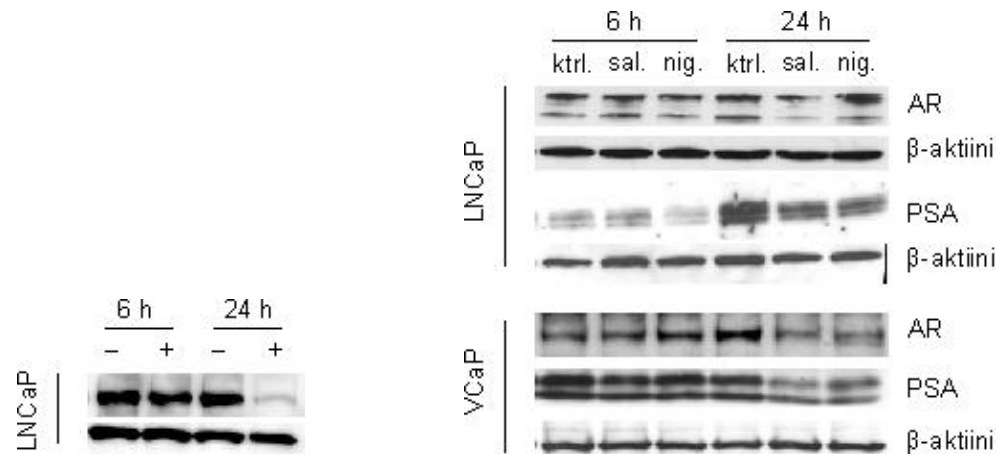
AR-proteiinin määrässä ei havaittu merkittäviä muutoksia vasteena millekään lääkeainekäsittelyllä 6:n eikä 24 h:n aikapisteessä. PSA-proteiininkaan määrässä ei havaittu johdonmukaista muutosta 6:n eikä 24 h:n aikapisteessä vasteena kummallekaan lääkeaineelle tai yhteiskäsittelylle. (Ks. kuvio 2.)

4.2 Monensiini, salinomysiini ja nigerisiini

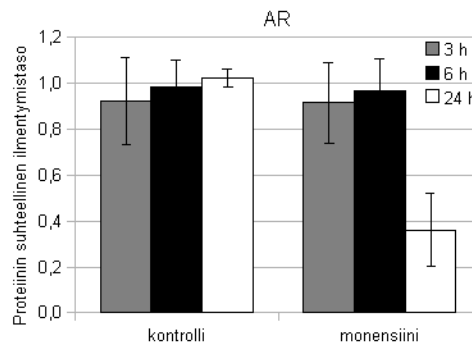
4.2.1 Vaikutukset androgeenivälitteiseen säätelyyn

Monensiinin vaikutusta LNCaP- ja VCaP-solujen androgeenivälitteiseen säätelyyn tutkittiin qRT-PCR:llä ja western blot -menetelmällä. Lääkeaineiden annettiin vaikuttaa 3, 6 tai 24 h ennen solujen hajottamista.

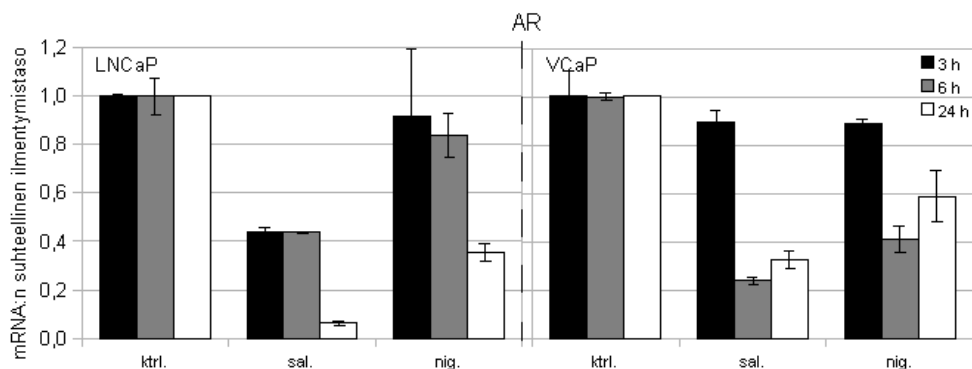
LNCaP-soluissa monensiini vähensi merkittävästi AR-proteiinin määrää 24 h:n aikapisteessä (ks. kuva 1 ja kuvio 4).



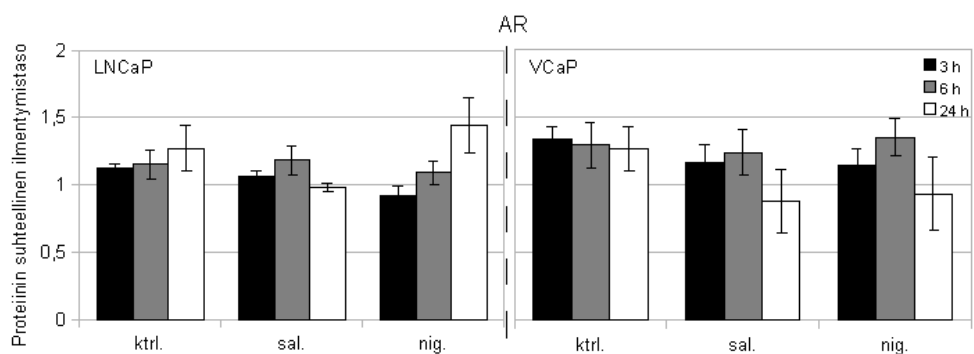
Kuva 1. Vasemmalla: western blot -kuva AR-proteiinin ilmentymistason muuttumisesta vasteena monensiinikäsittelylle (1 μ M, +) 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP-soluissa. Oikealla: western blot -kuva AR- ja PSA-proteiinin ilmentymistason muuttumisesta vasteena salinomysiinille (sal.) tai nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP- ja VCaP-soluissa.



Kuvio 4. AR-proteiinin ilmentymistason muuttuminen vasteena monensiinille (1 μ M) 3:n, 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP-soluissa.



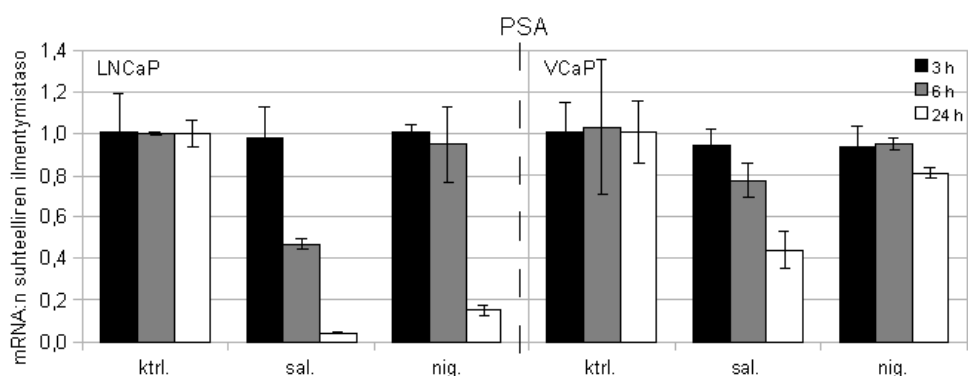
Kuvio 5. *AR*:n mRNA:n luentatason muuttuminen vasteena salinomysiinille (sal.) tai nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 3:n, 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP- ja VCaP-soluissa.



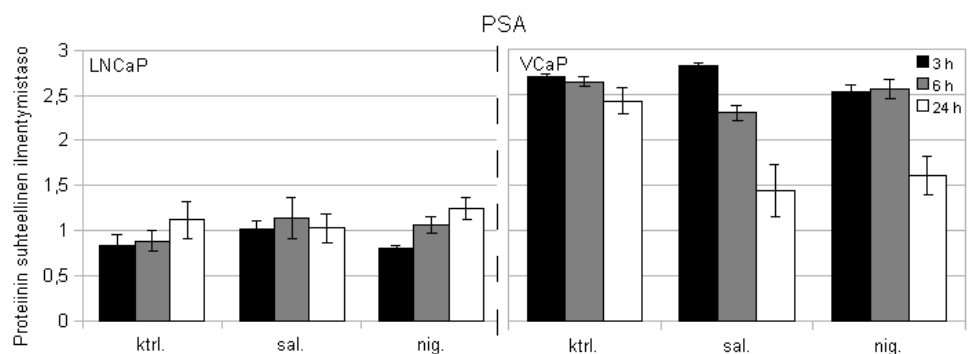
Kuvio 6. *AR*-proteiinin ilmentymistason muuttuminen vasteena salinomysiinille (sal.) tai nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 3:n, 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP- ja VCaP-soluissa.

LNCaP-soluissa sekä salinomysiini että nigerisiin olivat vähentäneet *AR*-geenin luentaa voimakkaasti 24 h:n aikapisteessä (94 ja 65 %). VCaP-soluissa sekä salinomysiini että nigerisiin olivat vähentäneet *AR*:n luentaa 6 h:n aikapisteessä (76 ja 59 %), mutta 24 h:n aikapisteessä *AR*:n luentataso oli noussut (68 ja 41 %). (Ks. kuvio 5.) Vastaavaa *AR*-proteiinin ilmentymisen vähenemistä LNCaP-soluissa ei kuitenkaan havaittu. VCaP-soluissa *AR*-proteiinin määrässä havaittiin vähenemistä 24 h:n kohdalla. (Ks. kuvio 6.)

LNCaP-soluissa PSA:n luentataso oli vähentynyt voimakkaasti vasteena salinomysiinille 6:n ja 24 h:n aikapisteessä (53 ja 96 %) sekä nigerisiinille 24 h:n aikapisteessä (85 %). VCaP-soluissa sekä salinomysiinin että nigerisiinin vaikutus PSA:n luentatasoon oli heikompi (24 h:n aikapisteessä 57 ja 19 %). (Ks. kuvio 7.) LNCaP-soluissa vastaavaa PSA-proteiinin määrän vähentymistä ei havaittu. VCaP-soluissa PSA:n määrä oli 24 h:n aikapisteessä laskenut. (Ks. kuvio 8.)



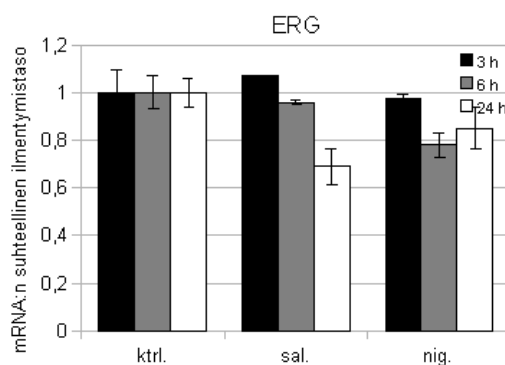
Kuvio 7. PSA:n mRNA:n luentatason muuttuminen vasteena salinomysiinille (sal.) tai nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 3:n, 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP- ja VCaP-soluissa.



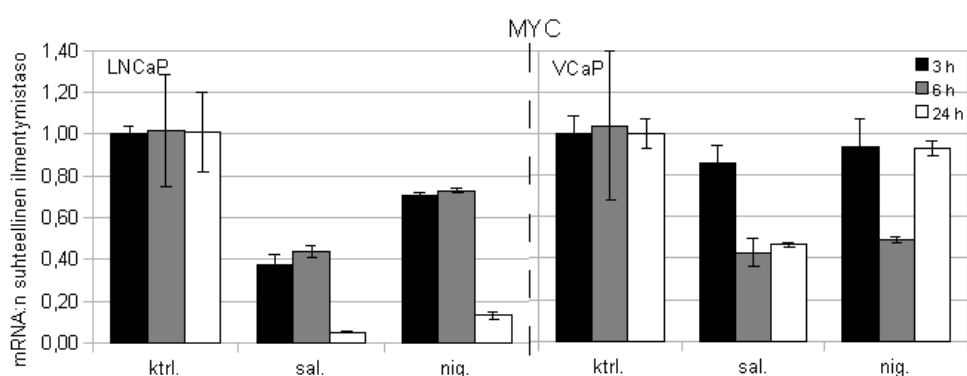
Kuvio 8. PSA-proteiinin ilmentymistason muuttuminen vasteena salinomysiinille (sal.) ja nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 3:n, 6:n ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP- ja VCaP-soluissa.

VCaP-soluissa salinomysiini ja nigerisiini olivat vähentäneet *ERG*-geenin luentaa jonkin verran 24 h:n aikapisteessä (31 ja 15 %) (ks. kuvio 9) ja *MYC*:n luentaa voimakkaammin jo 6 h:n aikapisteessä (59 ja 53 %) (ks. kuvio 10). 24 h:n aikapisteessä salinomysiini oli pitänyt *MYC*:n luentatason suurin piirtein samana kuin 6 h:n aikapisteessä, mutta nigerisiinillä käsitellyissä soluissa se oli noussut takaisin liki kontrollin tasolle (ks. kuvio 10).

LNCaP-soluissa sekä salinomysiini että nigerisiini vähensivät *MYC*:n luentaa kaikissa aikapisteissä ja erityisen voimakkaasti 24 h:n aikapisteessä (95 ja 87 %). (Ks. kuvio 10.)



Kuvio 9. *ERG*:n mRNA:n luentatason muuttuminen vasteena salinomysiinille (sal.) tai nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 3:n, 6:n tai 24 h:n aikapisteessä VCaP-soluissa.



Kuvio 10. *MYC*:n mRNA:n luentatason muuttuminen vasteena salinomysiinille (sal.) tai nigerisiinille (nig.) (1 μ M) 3:n, 6:n tai 24 h:n aikapisteessä LNCaP- ja VCaP-soluissa.

4.2.2 Vaikutukset oksidatiiviseen stressiin

Monensiinin aiheuttamat muutokset oksidatiiviseen stressiin liittyvien geenien luennassa validoitiin qRT-PCR:llä geenien *MT1F*, *MT1G*, *ATF3*, *KLF6*, *DDIT3*, *DDIT4* ja *TXNIP* osalta. Myös salinomysiinin ja nigerisiinin vaikutukset samojen geenien luentaan tutkittiin qRT-PCR:llä. qRT-PCR:n tulokset on koottu heatmapiksi kuvioon 11.

Monensiini, salinomysiini ja nigerisiini aiheuttivat samankaltaiset vasteet sekä LNCaP- että VCaP-soluissa. Sekä monensiini, salinomysiini että nigerisiini lasivat LNCaP- ja VCaP-soluissa voimakkaasti *TXNIP*-geenin luentaa. *TXNIP* (*thioredoxin-interacting protein*) osallistuu solunsisäisten reaktiivisten happiradikaalien määrän säätelyyn inhiboimalla tioredoksiineja. Tioredoksiinit toimivat soluissa antioksidantteina pelkistämällä muita proteiineja.

Monensiini, salinomysiini ja nigerisiini lisäsivät metallotioneiniinigeenien *MT1F* ja *MT1G* luentaa voimakkaasti 3:n ja 6 h:n aikapisteessä VCaP-soluissa ja 24 h:n aikapisteessä LNCaP-soluissa. Metallotioneiniinien tehtäviin kuuluu muun muassa vapaiden metallien ja happiradikaalien sitominen, joiden määrä kasvaa oksidatiivisessa stressissä. Metallotioneiniinigeenien ilmentyminen tehostuu vasteena oksidatiiviselle stressille.

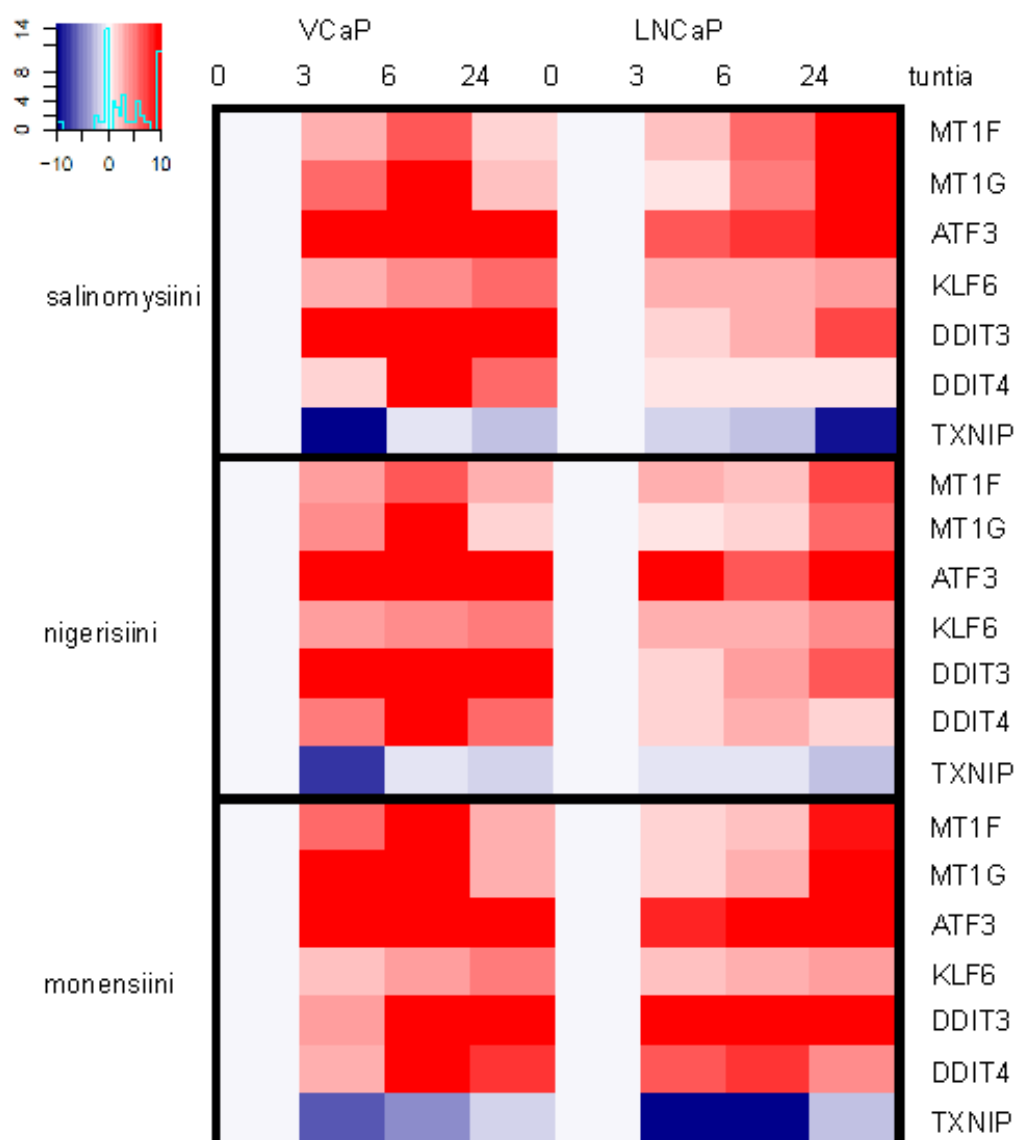
Monensiini, salinomysiini ja nigerisiini lisäsivät *ATF3*-geenin luentaa 3:n, 6:n ja 24 h:n aikapisteessä sekä LNCaP- että VCaP-soluissa. *KLF6*:n luenta oli myös voimistunut 24 h:n aikapistettä lähetessä kummassakin solulinjassa vasteena jokaiselle lääkeaineelle.

ATF3 (*activating transcription factor 3*) ja *KLF6* (*Krüppel-like factor 6*) ovat apoptoosiin liittyviä transkriptiotekijöitä. *ATF3*:a ilmentyy esimerkiksi oksidatiivisen stressin ja DNA:n vaurioitumisen seurauksena, ja sen vaikutuksesta solu siirtyy apoptoosiin (Hai & Hartman, 2001).

KLF6:n on havaittu säätelevän *ATF3*:n ilmentymistä joissain eturauhassyöpäsoluissa ja voivan käynnistää apoptoosin näissä soluissa *ATF3*-välitteisesti. *KLF6*:n ilmentymistaso nousee muun muassa oksidatiivisessa

stressissä, ja apoptoosin käynnistymiseksi vaaditaan sekä KLF6:n että ATF3:n ilmentymistä. (Huang & al., 2008.)

Muita luennaltaan voimistuneita geenejä vasteena kaikille kolmelle lääkeaineelle olivat DDIT:t 3 ja 4 (*DNA damage–inducible transcription factor*). VCaP-solulinjassa DDIT:t indusoituivat voimakkaasti vasteena salinomysiinille ja nigerisiinille, mutta LNCaP-soluissa heikommin. Monensiinin vaikutus oli voimakas kummassakin solulinjassa. DDIT3:a ja DDIT4:ää ilmentyy solulimakalvoston häiriötilan tai DNA:n vaurioitumisen aikaansaaman apoptoosin yhteydessä (Guan & al., 2009; Whitney & al., 2009).



Kuvio 11. Heat map oksidatiiviseen stressiin liittyvien geenien luentatason muutoksista (Kirsi Ketola, 2011).

5 ARVIOINTI

5.1 Disulfiraami ja X

Disulfiraamin (DSF) on todettu estävän valikoivasti eturauhasen syöpäsolujen kasvua *in vitro* ja hidastavan syöpäkasvainten kasvua *in vivo* (Iljin ym., 2009). Opinnäytetyössä DSF vähensi *AR*-geenin ja *AR*:n säätelyn alaisten geenien luentaa 24 h:n aikapisteessä.

Saatu tulos DSF:n kyvystä häiritä *AR*-välitteistä tiedonsiirtoa on osittain epäjohdonmukainen aikaisemmin julkaistujen tutkimustulosten kanssa, joissa vastaava *AR*:n luentatason aleneminen havaittiin vasta 48 h:n aikapisteessä (Iljin & al., 2009). Opinnäytetyössä saadun tuloksen perusteella DSF estäisi *AR*:n ilmentymistä jopa aikaisemmin havaittua nopeammin.

Ristiriitaisesti X vähensi *ERG*:n ja *MYC*:n luentaa, mutta lisäsi *AR*:n ja *PSA*:n luentaa *TMPRSS2-ERG*-fuusiogeeniä ilmentävissä VCaP-soluissa. VCaP-soluissa *ERG*-geeni on siirtynyt *AR*-välitteisen säätelyn alaiseksi, ja *MYC*-geenin ilmentyminen on puolestaan *ERG*:n säätelemää. X estää *ERG*:n luentaa todennäköisesti jonkin muun kuin *AR*-välitteisen tiedonsiirtoreitin kautta.

Yhteiskäytössä DSF:n kanssa X heikensi DSF:n vaikutusta kaikkien tutkittujen geenien, *AR*:n, *PSA*:n, *ERG*:n ja *MYC*:n, ilmentymisen eston suhteen. Mikäli X voimistaa DSF:n eturauhasen syöpäsolujen kasvua estävää vaikutusta, välittyy vaikutus todennäköisesti jonkin muun mekanismin kuin *AR*-välitteisen tiedonsiirron häirinnän kautta.

5.2 Monensiini, salinomysiini ja nigerisiini

Monensiinin on todettu estävän eturauhasen syöpäsolujen kasvua *in vitro*. Kaikista testatuista lääkeaineista monensiini oli yksi tehokkaimmista ja valikoivimmista eturauhasen syöpäsolujen kasvua estävistä aineista. (Iljin & al., 2009.) Eläinlääketieteessä monensiinia on käytetty antibioottina, joten se saattaisi soveltua myös ihmiskäyttöön.

Monensiini estää eturauhasen syöpäsolujen kasvua häiritsemällä AR-välitteistä tiedonsiirtoa sekä lisäämällä oksidatiivista stressiä ja apoptoosia valikoivasti eturauhasen syöpäsoluissa (Ketola & al., 2010). Opinnäytetyössä havaittiin, että myös monensiinin kanssa rakenteellisesti samankaltaiset salinomysiini ja nigerisiini vähensivät *AR*-geenin luentaa, *AR*-proteiinin ilmentymistä sekä tutkittujen geenien, *PSA*:n, *ERG*:n ja *MYC*:n, luentaa eturauhasen syöpäsoluissa.

Salinomysiini esti *AR*:n, *PSA*:n, *ERG*:n ja *MYC*:n luentaa tehokkaammin kuin nigerisiini. Sekä salinomysiini että nigerisiini vähensivät *AR*:n ilmentymistä voimakkaammin LNCaP-soluissa kuin *TMPRSS2-ERG*-fuusiogeeniä ilmentävissä VCaP-soluissa. Lisäksi *AR*:n säätelemän *PSA*:n luenta oli vähentynyt enemmän LNCaP- kuin VCaP-soluissa. Salinomysiini ja nigerisiini vähensivät myös *ERG*:n säätelemän *MYC*:n luentaa huomattavasti enemmän LNCaP-soluissa kuin VCaP-soluissa.

Salinomysiini ja nigerisiini vähensivät *AR*-geenin luentaa enemmän kuin monensiini (Ketola & al., 2010) sekä *TMPRSS2-ERG*-fuusiogeeniä ilmentävissä VCaP-soluissa että LNCaP-soluissa. VCaP-soluissa monensiini vähensi kuitenkin *AR*-proteiinin määrää 24 h:n aikapisteessä enemmän kuin salinomysiini tai nigerisiini. VCaP-soluissa salinomysiinin ja nigerisiinin vaikutus *AR*:n säätelemän *ERG*:n luentaan ei ollutkaan voimakkaampi kuin monensiinin, koska vasta muutokset itse *AR*-proteiinin määrässä tai aktiivisuudessa vaikuttavat sen säätelemien geenien luentaan. VCaP-soluissa salinomysiini ja nigerisiini eivät vaikuttaneet myöskään *ERG*:n säätelemän *MYC*:n luentaan monensiinia tehokkaammin, ja itse asiassa 24 h:n aikapisteessä nigerisiinin *MYC*:n luentaa vähentävä vaikutus olikin paljon monensiinin vaikutusta heikompi. LNCaP-soluissa

salinomyysiini ja nigerisiini vähensivät *AR*:n lisäksi myös *MYC*:n luentaa tehokkaammin kuin monensiini.

Sekä monensiini, salinomyysiini että nigerisiini lisäsivät oksidatiivisen stressin merkkigeenien ilmentymistä eturauhasen syöpäsoluissa. Voimakkaimmin oksidatiivista stressiä lisäsi monensiini. Pahanlaatuisissa eturauhasen syöpäsoluissa on oksidatiivista stressiä luontaisestikin enemmän kuin ei-pahanlaatuisissa soluissa, minkä takia eturauhasen syöpien hoitostrategiaksi on ehdotettu syöpäsolujen oksidatiivisen stressin lisäämistä edelleen kunnes ne siirtyvät apoptoosiin (Kumar & al., 2006; Khandrika & al., 2009).

ERG:n säätelemän *MYC*-geenin on havaittu olevan eturauhasen syövissä yleisesti monistunut ja yli-ilmentynyt syöpägeeni (Dong, 2006), joka osallistuu solujen suojelemiseen oksidatiiviselta stressiltä (Benassi & al., 2006). Oksidatiivisen stressin merkkigeenien ilmentyminen olikin voimistunut heikoimmin vasteena nigerisiinille, jonka *ERG*:n luentaa vähentävä vaikutus oli myös heikoin *TMPRSS2-ERG*-fuusiogeeniä ilmentävissä soluissa.

Opinnäytetyön tulosten perusteella monensiini, salinomyysiini ja nigerisiini häiritsevät *AR*-välitteistä tiedonsiirtoa ja lisäävät solunsisäistä oksidatiivista stressiä eturauhasen syöpäsoluissa. *AR*-välitteisen tiedonsiirron häirinnän lisäksi salinomyysiini ja nigerisiini estävät eturauhasen syövälle tärkeiden antioksidatiivisten syöpägeenien, *ERG*:n ja *MYC*:n, luentaa. Salinomyysiinin ja nigerisiinin tehokkuus *ERG*:n ja *MYC*:n luennan vähentämisessä vaikuttaakin heijastuvan niiden kykyyn lisätä solunsisäistä oksidatiivista stressiä.

LÄHTEET

- Afar, D.; Vivanco, I.; Hubert, R.; Kuo, J.; Chen, E.; Saffran, D.; Raitano, A. & Jakobovits A. 2001. Catalytic cleavage of the androgen-regulated TMPRSS2 protease results in its secretion by prostate and prostate cancer epithelia. *Cancer Research* 61, 1 686–1 692.
- Benassi, B.; Fanciulli, M.; Fiorentino, F.; Porrello, A.; Chiorino, G.; Loda, M.; Zupi, G. & Biroccio, A. 2006. c-Myc phosphorylation is required for cellular response to oxidative stress. *Molecular Cell* 21, 509–519.
- Blanchere, M.; Berthaut, I.; Portois, M.; Mestayer, C. & Mowszowicz, I. 1998. Hormonal regulation of the androgen receptor expression in human prostatic cells in culture. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 66, 319–326.
- Bostwick, D.; Shan, A.; Qian, J.; Darson, M.; Maihle, N.; Jenkins, R. & Cheng, L. 1998. Independent origin of multiple foci of prostatic intraepithelial neoplasia. Comparison with matched foci of prostate carcinoma. *Cancer* 83, 1 995–2 002.
- Brar, S.; Grigg, G.; Wilson, K.; Holder, W., Jr.; Dreau, D.; Austin, C.; Foster, M.; Ghio, A.; Whorton, A.; Stowell, G.; Whittall, L.; Whittle, R.; White, D. & Kennedy, T. 2004. Disulfiram inhibits activating transcription factor/cyclic AMP-responsive element binding protein and human melanoma growth in a metal-dependent manner *in vitro*, in mice and in a patient with metastatic disease. *Molecular Cancer Therapeutics* 3, 1 049–1 060.
- Buchanan, G.; Greenberg, N.; Scher, H.; Harris, J.; Marshall, V. & Tilley, W. 2001. Collocation of androgen receptor gene mutations in prostate cancer. *Clinical Cancer Research* 7, 1 273–1 281.
- Cooke, P.; Young, P. & Cunha, G. 1991. Androgen receptor expression in developing male reproductive organs. *Endocrinology* 128, 2 867–2 873.
- Culig, Z.; Hobisch, A.; Cronauer, M.; Cato, A.; Hittmair, A.; Radmayr, C.; Eberle, J.; Bartsch, G. & Klocker, H. 1993. Mutant androgen receptor detected in an advanced-stage prostatic carcinoma is activated by adrenal androgens and progesterone. *Molecular Endocrinology* 7, 1 541–1 550.
- Cunha, G.; Hayward, S. & Wang, Y. 2002 Role of stroma in carcinogenesis of the prostate. *Differentiation* 70, 473–485.
- Dehm, S. & Tindall, D. 2005. Regulation of androgen receptor signaling in prostate cancer. *Expert Reviews of Anticancer Therapies* 5, 63–74.
- Dong, J. 2006. Prevalent mutations in prostate cancer. *Journal of Cellular Biochemistry* 97, 433–447.
- Eisenberger, A. 2008. The current knowledge of hormonal therapy in the treatment of prostate cancer. Teoksessa: Pestell, R. & Nevalainen, M. (toim.) *Current Clinical Oncology: Prostate Cancer: Signaling Networks, Genetics, and New Treatment Strategies*. New Jersey: Humana Press, 339–354.
- Evans, R. 1988. The steroid and thyroid hormone receptor superfamily. *Science* 240, 889–895.
- Feldman, B. & Feldman, D. 2001. The development of androgen-independent prostate cancer. *Nature Reviews Cancer* 1, 34–45.
- Gelmann, E. 2008. Prostate molecular oncogenesis: Gene deletions and somatic mutations. Teoksessa: Pestell, R. & Nevalainen, M. (toim.) *Current Clinical Oncology: Prostate Cancer: Signaling Networks, Genetics, and New Treatment Strategies*. New Jersey: Humana Press, 71–97.

- Grossmann, M.; Huang, H. & Tindall, D. 2001. Androgen receptor signaling in androgen-refractory prostate cancer. *Journal of the National Cancer Institute* 93, 1 687–1 697.
- Guan, L.; Han, B.; Li, Z.; Hua, F.; Huang, F.; Wei, W.; Yang, Y. & Xu, C. 2009. Sodium selenite induces apoptosis by ROS-mediated endoplasmic reticulum stress and mitochondrial dysfunction in human acute promyelocytic leukemia NB4 cells. *Apoptosis* 14, 218–225.
- Gupta, P.; Onder, T.; Guozhi, J.; Tao, K.; Kuperwasser, C.; Weinberg, R. & Lander, E. 2009. Identification of selective inhibitors on cancer stem cells by high-throughput screening. *Cell* 138, 645–659.
- Hai, T. & Hartman, M. 2001. The molecular biology and nomenclature of the activating transcription factor/cAMP-responsive element binding family of transcription factors: activating transcription factor proteins and homeostasis. *Gene* 273: 1–11.
- Harris, S.; Rong, Z.; Harris, M. & Lubahn, D. 1990. Androgen receptor in human prostate carcinoma LNCaP/ADEP cells contains a mutation which alters the specificity of the steroid-dependent transcriptional region. *Endocrinology* 126 (Suppl.), 93–97.
- Hasuda, K.; Lee, C. & Tannock, I. 1994. Antitumor activity of nigericin and 5-(N-ethyl-N-isopropyl)amiloride: an approach to therapy based on cellular acidification and the inhibition of regulation of intracellular pH. *Oncology Research* 6, 259–268.
- Hayward, S.; Baskin, L.; Haughney, P.; Cunha, A.; Foster, B., Dahiya, R.; Prins, G. & Cunha, G. 1996. Epithelial development in the rat ventral prostate, anterior prostate and seminal vesicle. *Acta Anatomica* 155, 81–93.
- Helenius, M.; Waltering, K. & Visakorpi, T. 2008. Somatic changes in prostate cancer: Androgen receptor alterations. Teoksessa: Pestell, R. & Nevalainen, M. (toim.) *Current Clinical Oncology: Prostate Cancer: Signaling Networks, Genetics, and New Treatment Strategies*. New Jersey: Humana Press, 99–128.
- Helgeson, B.; Tomlins, S.; Shah, N.; Laxman, B.; Cao, Q.; Prensner, J.; Cao, X.; Singla, N.; Montie, J.; Varambally, S.; Mehra, R. & Chinnaiyan, A. 2008. Characterization of *TMPRSS2:ETV5* and *SLC45A3:ETV5* gene fusions in prostate cancer. *Cancer Research* 68, 73–80.
- Horoszewicz, J.; Leong, S.; Chu, T., Wajzman, Z.; Friedman, M.; Papsidero, L.; Kim, U.; Chai, L.; Kakati, S.; Arya, S. & Sandberg, A. 1980. The LNCaP cell line – A new model for studies on human prostatic carcinoma. *Progress in Clinical & Biological Research* 37, 115–132.
- Huang, X.; Li, X. & Guo, B. 2008. KLF6 induces apoptosis in prostate cancer cells through up-regulation of ATF3. *Journal of Biological Chemistry* 283, 29 795–29 801.
- Huggins, C. & Hodges, C. 1941. The effect of castration, of estrogen and of androgen injection on serum phosphatases in metastatic carcinoma of the prostate. *Cancer Research* 1, 293–297.
- Iljin, K.; Wolf, M.; Edgren, H.; Gupta, S.; Kilpinen, S.; Skotheim, R.; Peltola, M.; Smit, F.; Verhaegh, G.; Schalken, J.; Nees, M. & Kallioniemi, O. 2006. *TMPRSS2* fusions with oncogenic ETS factors in prostate cancer involve unbalanced genomic rearrangements and are associated with HDAC1 and genetic reprogramming. *Cancer Research* 66, 10 242–10 246.
- Jariwala, U.; Prescott, J.; Jia, L.; Barski, A.; Pregizer, S.; Cogan, J.; Arasheben, A.; Tilley, W.; Scher, H.; Gerald, W.; Buchanan, G.; Coetzee, G. & Frenkel, B. 2007. Identification of novel androgen receptor target genes in prostate cancer. *Molecular Cancer* 6.
- Ketola, K.; Vainio, P.; Fey, V.; Kallioniemi, O. & Iljin, K. 2010. Monensin is a potent inducer of oxidative stress and inhibitor of androgen signaling leading to apoptosis in prostate cancer cells. *Molecular Cancer Therapeutics* 9, 3 175–3 185.

- Khandrika, L.; Kumar, B.; Koul, S.; Maroni, P. & Koul, H. 2009. Oxidative stress in prostate cancer. *Cancer Letters* 2009, 125–136.
- Kinzler, K. & Vogelstein, B. 1996. Lessons from hereditary colorectal cancer. *Cell* 87, 159–170.
- Klokk, T.; Kurys, P.; Elbi, C.; Nagaich, A.; Hendarwanto, A.; Slagswold, T.; Chang, C.; Hager, G. & Saatcioglu, F. 2007. Ligand-specific dynamics of the androgen receptor at its response element in living cells. *Molecular & Cellular Biology* 27, 1 823–1 843.
- Korenchuk, S.; Lehr, J.; McLean, L.; Lee, Y.; Whitney, S.; Vessela, R.; Lin, D. & Pienta, K. 2001. VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer. *In Vivo* 15, 163–168.
- Kumar, B.; Koul, S.; Khandrika, L.; Meacham, R. & Koul, H. 2008. Oxidative stress is inherent in prostate cancer cells and is required for aggressive phenotype. *Cancer Research* 68, 1 777–1 785.
- Kyprianou, N. & Isaacs, J. 1988. Activation of programmed cell death in the rat ventral prostate after castration. *Endocrinology* 122, 552–562.
- Lin, B.; Ferguson, C.; White, J.; Wang, S.; Vessella, R.; True, L.; Hood, L. & Nelson, P. 1999. Prostate-localized and androgen-regulated expression of the membrane-bound serine protease TMPRSS2. *Cancer Research* 59, 4 180–4 184.
- MacLean, H.; Warne, G. & Zajac, J. 1997. Localization of functional domains in the androgen receptor. *Journal of Steroid Biochemistry & Molecular Biology* 62, 233–242.
- Marikovsky, M.; Nevo, N.; Vadai, E. & Harris-Cerruti, C. 2002. Cu/Zn superoxide dismutase plays a role in angiogenesis. *International Journal of Cancer* 97, 34–41.
- Mollenhauer, H.; Morre, D. & Rowe, L. 1990. Alteration of intracellular traffic by monensin; mechanism, specificity and relationship to toxicity. *Biochimica & Biophysica Acta* 1 031, 225–246.
- Mooradian, A.; Morley, J. & Korenman, S. 1987. Biological actions of androgens. *Endocrine Reviews* 8, 1–28.
- Mora, G. & Mahesh, V. 1999. Autoregulation of the androgen receptor at the translational level: Testosterone induces accumulation of androgen receptor mRNA in the rat ventral prostate polyribosomes. *Steroids* 64, 587–591.
- Naar, A.; Lemon, B. & Tjian, R. 2001. Transcriptional activation complexes. *Annual Review of Biochemistry* 70, 475–501.
- Park, W.; Seol, J.; Kim, E.; Kang, W.; Im, Y.; Jung, C.; Kim, B. & Lee, Y. 2002. Monensin-mediated growth inhibition in human lymphoma cells through cell cycle arrest and apoptosis. *British Journal of Haematology* 119, 400–407.
- Park, W.; Kim, E.; Jung, C.; Kim, B. & Lee, K. 2003a. Monensin-mediated growth inhibition of SNU-C1 colon cancer cells via cell cycle arrest and apoptosis. *International Journal of Oncology* 22, 377–382.
- Park, W.; Jung, C.; Park, J.; Kim, K.; Kim, W.; Im, Y.; Lee, M.; Kang, W. & Park, K. 2003b. Monensin inhibits the growth of renal cell carcinoma via cell cycle arrest or apoptosis. *International Journal of Oncology* 22, 855–860.
- Park, W.; Kim, E.; Kim, B. & Lee, Y. 2003c. Monensin-mediated growth inhibition in NCI-H929 myeloma cells via cell cycle arrest and apoptosis. *International Journal of Oncology* 23, 197–204.

- Petrovics, G.; Liu, A.; Shaheduzzaman, S.; Furasato, B.; Sun, C.; Chen, Y.; Nau, M.; Ravindranath, L.; Chen, Y.; Dobi, A.; Srikanthan, V.; Sesterhenn, I.; McLeod, D.; Vahey, M.; Moul, J. & Srivastava, S. 2005. Frequent overexpression of ETS-related gene 1 (ERG1) in prostate cancer transcriptome. *Oncogene* 24, 3 847–3 852.
- Pratt, W. & Toft, D. 1997. Steroid receptor interactions with heat shock protein and immunophilin chaperones. *Endocrine Reviews* 18, 306–360.
- Romanuik, L.; Wang, G.; Holt, R.; Jones, S.; Marra, M. & Sadar, M. 2009. Identification of novel androgen-responsive genes by sequencing of LongSAGE libraries. *BMC Genomics* 10.
- Ruizeweld de Winter, J.; Janssen, P.; Sleddens, H.; Verleun-Mooijman, M.; Trapman, J.; Brinkmann, A.; Santerse, A.; Schroder, F. & van der Kwast, T. 1994. Androgen receptor status in localized and locally progressive hormone refractory human prostate cancer. *American Journal of Pathology* 144, 735–746.
- Seth, A. & Watson, D. 2005. ETS transcription factors and their emerging roles in human cancer. *European Journal of Cancer* 41, 2462–2478.
- Shang, Y.; Myers, M. & Brown, M. 2002. Formation of the androgen receptor transcription complex. *Molecular Cell* 9, 601–610.
- Siiteri, P. & Wilson, J. 1973. Testosterone formation and metabolism during male sexual differentiation in the human embryo. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 38, 113–125.
- Suomen Syöpärekisteri 2009. Cancer in Finland 2006 and 2007. 76. julkaisu. Helsinki: Suomen Syöpäyhdistys.
- Tomlins, S.; Rhodes, D.; Perner, S.; Dhanasekaran, S.; Mehra, R.; Sun, X.-W.; Varambally, S.; Cao, X.; Tchinda, J.; Kuefer, R.; Lee, C.; Montie, J.; Shah, R.; Pienta, K.; Rubin, M. & Chinnaiyan, A. 2005. Recurrent fusion of *TMPRSS2* and *ETS* transcription factor genes in prostate cancer. *Science* 310, 644–648.
- Tomlins, S.; Mehra, R.; Rhodes, D.; Smith, L.; Roulston, D.; Helgeson, B.; Cao, X.; Wei, J.; Rubin, M.; Shah, R. & Chinnaiyan, A. 2006. *TMPRSS2:ETV4* gene fusions define a third molecular subtype of prostate cancer. *Cancer Research* 66, 3396–3400.
- Tomlins, S.; Mehra, R.; Rhodes, D.; Cao, X.; Wang, L.; Dhanasekaran, S.; Kalyana-Sundaram, S.; Wei, J.; Rubin, M.; Pienta, K.; Shah, R. & Chinnaiyan, A. 2007a. Integrative molecular concept modeling of prostate cancer progression. *Nature Genetics* 39, 41–51.
- Tomlins, S.; Laxman, B.; Dhanasekaran, S.; Helgeson, B.; Cao, X.; Morris, D.; Menon, A.; Jing, X.; Cao, Q.; Han, B.; Yu, J.; Wang, L.; Montie, J.; Rubin, M.; Pienta, K.; Roulston, D.; Shah, R.; Varambally, S.; Mehra, R. & Chinnaiyan, A. 2007b. Distinct classes of chromosomal rearrangements create oncogenic ETS gene fusions in prostate cancer. *Nature* 448, 595–599.
- Tomlins, S.; Laxman, B.; Varambally, S.; Cao, X.; Yu, J.; Helgeson, B.; Cao, Q.; Prensner, J.; Rubin, M.; Shah, R.; Mehra, R. & Chinnaiyan, A. 2008. Role of the *TMPRSS2-ERG* gene fusion in prostate cancer. *Neoplasia* 10, 177–188.
- Van Bokhoven, A.; Varella-Garcia, M.; Korch, C.; Johannes, W.; Smith, E.; Miller, H.; Nordeen, S.; Miller, G. & Lucia, M. 2003. Molecular characterization of human prostate carcinoma cell lines. *Prostate* 57, 202–225.
- Velasco, A.; Gillis, K.; Li, Y.; Brown, E.; Sadler, T.; Achilleos, M.; Greenberger, L.; Frost, P.; Bai, W. & Zhang, Y. 2004. Identification and validation of novel androgen-regulated genes in prostate cancer. *Endocrinology* 145, 3 913–3 924.
- Veldscholte, J.; Ris-Stalpers, C.; Kuiper, G.; Jenster, G.; Berrevoets, C.; Claassen, E.; van Rooij, H.; Trapman, J.; Brinkmann, A. & Mulder, E. 1990. A mutation in the ligand binding do-

main of the androgen receptor of human LNCaP cells affects steroid binding characteristics and response to antiandrogens. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 173, 534–540.

Visakorpi, T. 1999. Molecular genetics of prostate cancer. *Annales Chirurgiae & Gynaecologiae* 88, 11–16.

Wilbert, D.; Griffin, J. & Wilson, J. 1982. Characterization of the cytosol androgen receptor of the human prostate. *Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 56, 113–120.

Whitney, M.; Jefferson, L. & Kimball, S. 2009. ATF4 is necessary and sufficient for ER stress-induced upregulation of REDD1 expression. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 379, 451–455.

Xu, L.; Su, Y.; Labiche, R.; Segawa, T.; Shanmugam, N.; McLeod, D.; Moul, J. & Srivastava, S. 2001. Quantitative expression profile of androgen-regulated genes in prostate cancer cells and identification of prostate-specific genes. *International Journal of Cancer* 92, 322–328.

Zhao, X.; Malloy, P.; Krishnan, A.; Swami, S.; Navone, N.; Peehl, D. & Feldman, D. 2000. Glucocorticoids can promote androgen-independent growth of prostate cancer cells through a mutated androgen receptor. *Nature Medicine* 6, 703–706.